DIE ORGANISMEN DES SAUERTEIGS

UND

IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE BROTGÄHRUNG.

Inaugural-Dissertation

der

mathematischen und naturwissenschaftlichen Facultät

der

Kaiser-Wilhelms-Universität Strassburg

zur Erlangung der Doctorwürde

vorgelegt von

W. L. Peters

aus Hamburg.

ACAD. LUGD. BAT. BIBL.

1889.

DIE ORGANISMEN DES SAUERTEIGS
UND
IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE BROTGÄHRUNG.

Um dem Brote eine lockere Beschaffenheit zu geben, werden zwei wesentlich verschiedene Wege eingeschlagen. Der ältere und wenigstens in Deutschland, noch immer gebräuchlichere ist der, in dem Brotteige eine Gährung hervorzurufen, welche durch die dabei auftretende Gasentwickelung den Teig lockert; in neuerer Zeit hat man dann versucht, und zwar bis zu einem gewissen Grade mit Erfolg, durch Hinzufügen chemischer Ingredienzen, die beim Erwärmen oder auch schon in der Kälte Gase entwickeln, und auch durch Sättigen des zur Teigbereitung verwandten Wassers mit Kohlensäure unter Druck, wobei dann die Teigbereitung in geschlossenen Gefässen zu geschehen hat, zu demselben Resultate zu gelangen. Jene Gährung nun kann wieder auf zweierlei Weise erzielt werden.

1. Man lässt Mehl und Kleie mit Wasser zu einem dünnen Teige angerührt an einem warmen Orte stehen; es tritt Gährung ein, und die gegohrene Masse wird dann benutzt, um den Brotteig in Gährung zu versetzen. Vor dem Backen wird nun von diesem etwas aufgehoben, um beim nächsten Backen wieder als Gährungserreger zu dienen. In dieser Weise wird das Ferment fortgepflanzt. In civilisirten Gegenden kommt jene primäre Herstellung des »Sauerteigs« im Allgemeinen nicht mehr vor [1]). Um denselben in gutem Zustand zu erhalten, ist es nöthig, ihn von Zeit zu Zeit »aufzufrischen«, das geschieht entweder durch Verkneten mit Mehl und Wasser oder durch Hinzufügen eines Malzaufgusses; doch kann hier auf technische Einzelheiten nicht näher eingegangen werden, und ich verweise bezüglich dieser auf Birnbaum's Lehrbuch der landwirthschaftlichen Gewerbe.

2. Man setzt zu dem Teige Brauereihefe oder Presshefe, beide wesentlich aus *Saccharomyces cerevisiae* bestehend.

Seit man sich nun mit der Natur der Gährungen eingehender beschäftigt hat, ist auch die Brotgährung der Gegenstand ziemlich zahlreicher Untersuchungen gewesen. Trotzdem sind wir von einer genauen Kenntniss dieses Vorganges noch sehr weit entfernt, ja, die verschiedenen Forscher haben in den Hauptpunkten diametral entgegengesetzte Ansichten.

Die ältere Anschauung sah in der Brotgährung eine durch Sprosshefe hervorgerufene alcoholische Gährung des im Mehl schon vorhandenen oder bei der Behandlung mit Wasser durch ein diastatisches Ferment gebildeten Zuckers. Diese Ansicht wurde gestützt durch verschiedene Analysen, die im Mehl das nöthige Gährmaterial, den Zucker, und sowohl im gegohrenen Teig als im Brot das Gährproduct, den Alcohol, nachwiesen. Was den Gährungserreger anbetrifft, so wird ja durch den Zusatz von Hefe ein Organismus in den Teig gebracht, der alcoholische Gährung hervorzurufen im Stande ist, und für den Sauerteig wurde wenigstens ein Sprosspilz durch die mikroskopische Untersuchung nachgewiesen, der später mit dem *Saccharomyces minor* Engel identificirt wurde, und dem man, freilich wohl zunächst ohne genauere Untersuchung, hier die Erregung der Alcoholgährung zuschrieb.

Im Jahre 1883 trug nun Chicandard in

[1]) Siehe einige interessante Ausnahmen bei E. Laurent, La bactérie de la fermentation panaire. (Bulletins de l'Académie Royale des Sciences de Belgique. 3. serie. T. X. 1885.)

der Académie des sciences eine Ansicht vor, nach welcher die Brotgährung durch ein Bacterium hervorgerufen wird, und in einer Zersetzung der im Mehl enthaltenen Eiweisskörper besteht [1]).

Er bringt jedoch für seine Anschauung Argumente vor, die theils unrichtig sind, theils den daraus gezogenen Schluss nicht rechtfertigen. Zunächst behauptet er, dass Stärke in der Kälte nicht durch Diastase gelöst werde; es ist aber schon vor dem Erscheinen seiner Untersuchung nachgewiesen worden, dass dies unter Umständen in der That stattfindet [2]).

Ferner giebt er an, der Zucker im Mehl nehme während der Gährung nicht ab. Hieraus geht jedenfalls hervor, dass sein erstes Argument mindestens belanglos ist; denn wenn sich schon Zucker im Mehl vorfindet, so braucht er ja nicht erst gebildet zu werden, war er aber im trockenen (etwa mit Alcohol ausgezogenen) Mehl nicht nachweisbar, und fand sich im wässerigen Auszug, so muss er durch ein Ferment gebildet sein, denn während so kurzer Zeit können Bacterien nicht wohl wirken. Was nun die Constanz des Zuckergehalts betrifft, so scheint zunächst aus Birnbaum's Angaben das Gegentheil hervorzugehen und im Uebrigen könnte ja während der Brotgährung durch Diastase oder durch Bacterien von Neuem Stärke gelöst werden. Drittens soll kein Alcohol im Sauerteig nachweisbar sein. Birnbaum und Andere behaupten das Gegentheil, und ich habe die letztere Ansicht bestätigen können. Sodann wird die Gegenwart von Sprosspilzen im Sauerteig geleugnet. Diese Behauptung steht mit vielen älteren und neueren Angaben im Widerspruch, und wir werden sehen, dass dieselbe auf Irrthum beruht. Dass *Saccharomyces cerevisiae*, in den Brotteig gebracht, alcoholische Gährung hervorrufe, sucht Chicandard durch die Angabe zu widerlegen, dass dieser Organismus während der Brotgährung allmählich zu Grunde gehe. Dieses Argument ist aber nicht stichhaltig, denn bekanntlich kann man durch *Saccharomyces cerevisiae* in reiner Zuckerlösung eine lebhafte Gährung hervorbringen, wobei derselbe allmählich, wenn auch unter Umständen nur sehr langsam, aus Mangel an anderen Nährstoffen zu Grunde geht. Es könnten also im Brotteige irgendwie ungünstige Lebensbedingungen vorliegen, die, ohne seine Gährwirkung zunächst zu hindern, ihn allmählich zu Grunde richten. Die Wirkung des *Saccharomyces cerevisiae* im Teige führt Chicandard auf eine Begünstigung des Wachsthums der gährungserregenden Bacterien zurück, ohne jedoch eine eingehende Begründung hierfür zu bringen. Zur Unterstützung dieser Ansicht wird nur angeführt, dass man die betreffenden Bacterien in Wasser, welches Hefezellen suspendirt enthält, cultiviren könne, ein Versuch, der nicht sehr beweisend sein dürfte. Chicandard identificirt die Brotgährung mit einer beginnenden Eiweissfäulniss. Als Belege hierfür bringt er eine Analyse des vergohrenen Sauerteigs, aus der hervorgeht, dass während der Gährung Eiweiss in Peptone übergeführt wird, und ferner eine Analyse der Gährungsgase (70 % CO_2 im übrigen H und N), die eine Uebereinstimmung mit der Zusammensetzung der bei Fäulniss entweichenden Gase zeigt. Abgesehen davon, dass eine Ueberführung von Eiweiss in Pepton noch nicht den Anfang der Fäulniss bedeuten muss, und die Zusammensetzung des Gases auch auf andere Weise zu Stande kommen kann [1]), wäre zu erwarten, dass, hätte Chicandard Recht, bei längerer Aufbewahrung des Sauerteigs sich nun die eigentlichen Fäulnisserscheinungen geltend machten. Dies trifft aber nicht zu. Vielmehr bewahrt der Sauerteig lange Zeit seinen angenehmen, fast obstartigen Geruch. Dass bei sehr langer Aufbewahrung unter Umständen andere Erscheinungen auftreten können, kommt für den in Rede stehenden Punkt nicht in Betracht. Chicandard's Behauptungen sind also durchaus ungenügend gestützt. Am gleichen Orte [2]) finden sich noch einige kleinere Mittheilungen über den Gegenstand. Marcano stimmt, ohne Wesentlich Neues zu bringen, mit Chicandard überein. Moussette betont die Entstehung von Alcohol bei der Brotgährung, steht also mit

[1]) Comptes rendus 1883.

[2]) J. Baranetzky, Die stärkeumbildenden Fermente in den Pflanzen.

Vergl. auch Pfeffer, Pflanzengeographie.

[1]) Zum Beispiel etwa so, dass die Kohlensäure durch alcoholische Gährung, der Wasserstoff durch Buttersäuregährung geliefert würde; der Stickstoff könnte leicht aus der im Sauerteig eingeschlossenen atmosphärischen Luft stammen, da nicht einzusehen ist, wie man diese von den entstehenden Gährungsgasen trennen kann.

[2]) Comptes rendus 1883.

Chicandard im Widerspruch und Boutroux isolirt aus dem Sauerteige ausser Bacterien, die er nicht genauer untersucht, vier Sprosspilzformen, auf die ich später zurückkommen werde, glaubt im Uebrigen, die Brotgährung einer gemeinsamen Wirkung von Sprosspilzen und Bacterien zuschreiben zu müssen.

Ferner hat Laurent[1]) bei Gelegenheit einer Untersuchung über eine in Belgien in grösserem Maasse auftretende Brotverderbniss sich auch mit der normalen Brotgährung beschäftigt, und in Verfolgung von Chicandard's Ansicht einen *Bacillus panificans* aus dem Sauerteig isolirt, den er als Erreger dieser Gährung ansieht. Er will das dadurch beweisen, dass eine Reincultur dieses Bacillus, in Teig gebracht, dort eine der normalen ähnliche Gährung hervorbringe. Der Ausdruck »ähnliche Gährung« ist nicht geeignet, einen vorurtheilsfreien Leser zu überzeugen, da übrigens Laurent selbst sagt, dass im Mehl der *Bacillus panificans* vorhanden sei, — und ich kann versichern, dass noch mancherlei anderes darin ist — und Laurent irgendwelche Sterilisation nicht vorgenommen zu haben scheint, so fehlt dem Versuch jede Beweiskraft.

In einer Abhandlung »Fermentation in its relation to bread making« sucht W. Jago die ältere Anschauung wieder zur Geltung zu bringen[2]). Er kommt zu dem Endresultat, dass die Brotgährung wesentlich eine durch *Saccharomyces* veranlasste alcoholische Gährung sei. Doch sind seine Gründe keineswegs stichhaltig und besonders nicht geeignet, Chicandard's Behauptungen zu widerlegen.

Er zeigt nur, dass Bierhefe in einem wässerigen Mehlaufguss eine lebhafte Gährung hervorbringt, die er quantitativ durch Auffangen des entwickelten Gases, freilich in ziemlich ungenauer Weise, bestimmt. Er berechnet, dass der im Aufguss enthaltene Zucker, welcher während der Gährung nach seiner Angabe nahezu vollkommen verschwindet, bei weitem genügen würde, um bei Zerlegung in Alcohol und Kohlensäure jene Gasmenge zu liefern. Endlich zeigt er, dass *Saccharomyces cerevisiae* in möglichst gereinigtem Kleber keine nennenswerthe Gährung hervorbringt. Da nun Chicandard die Eiweisszersetzung ja nicht einem *Saccharomyces*, sondern einem Bacterium zuschreibt, so ist mit diesen Ausführungen nichts gewonnen, ausserdem sind Jago's Versuche, die sich auch auf Stärkelösung durch Mehlaufguss beziehen, wegen gänzlicher Unterlassung der Sterilisation zum Theil werthlos.

In neuester Zeit hat nun Dünnenberger[1]) eine Untersuchung veröffentlicht, auf Grund deren er ebenfalls zu dem Resultat kommt, dass die Brotgährung wesentlich alcoholische Gährung, durch *Saccharomyces* hervorgerufen, sei, und dass die Bacterien zum mindesten überflüssig, wenn nicht sogar schädlich seien. Doch sind auch die Gründe dieses Forschers nicht durchaus stichhaltig. Zunächst bestätigt Dünnenberger, dass im Mehl ein Stärke in Zucker umwandelndes Ferment, das Cerealin, vorhanden ist. Die hierauf bezüglichen Versuche sind ziemlich einwurfsfrei, da bei 70° C. innerhalb 4 Stunden von Bacterien kaum eine nennenswerthe Wirkung zu erwarten ist, doch muss bemerkt werden, dass der negative Erfolg der Aussaat in Koch'sche Gelatine nicht als Beweis für Mangel an lebenden Bacterien angesehen werden kann, denn was im Kleister wächst, braucht noch nicht in Gelatine zu wachsen. Es ist merkwürdig, dass in dieser Beziehung immer wieder gefehlt wird, nachdem oft genug auf diesen Punkt hingewiesen worden ist[2]). Ich werde an anderer Stelle Gelegenheit haben, einen sehr schlagenden Beleg für die Schwäche dieser Beweisführung zu geben. Ferner sucht Dünnenberger den Beweis zu erbringen, dass *Saccharomyces cerevisiae* im Teige Gährung hervorbringen könne ohne Beihülfe von Bacterien. Es sind in Bezug hierauf zweierlei Versuche angestellt. Erstens wurde Flüssigkeit, die Mehl, Ammoniumnitrat und Hefeasche enthielt, und zum Zweck der Sterilisation an 5 aufeinanderfolgenden Tagen und darauf noch zweimal mit je einem Tag Zwischenzeit aufgekocht worden war, mit vorher möglichst von Bacterien befreiter Presshefe versetzt. Es trat Gährung ein. Obgleich, wie wir sehen werden, dieses Resultat richtig ist, so genügt doch dieser Versuch zur correcten Beweisführung nicht, denn es giebt Bacterien, die innerhalb 24 Stunden den Entwickelungsgang von Spore zu Spore durchlaufen, die also, falls die Spo-

[1]) l. c.
[2]) The Journal of the Society of Chemical Industry. 1887. 29. März. p. 164—170.

[1]) Botanisches Centralblatt. 1888.
[2]) cf. Hüppe, Methoden der Bacterienforschung.

ren das Kochen ertragen, nicht oder doch nicht beim ersten oder zweiten Mal getödtet werden. Dass dieser Einwand nicht aus der Luft gegriffen ist, geht aus folgendem Versuch hervor, den ich durch die Güte eines Herrn vom Strassburger botanischen Institut mit dessen Material anstellen konnte. Erbsen, die mit den Sporen eines endosporen Bacillus inficirt waren, wurden in Wasser aufgekocht und unter genügendem Verschluss stehen gelassen; nach genau 24 Stunden konnte ich in der Haut, welche sich auf der Flüssigkeit gebildet hatte, eine ziemlich bedeutende Anzahl völlig reifer Sporen nachweisen. Ist nun ein solches Bacterium im Stande, Stärke zu saccharificiren, so kann dadurch obiger Versuch gefälscht werden. Dass in dem Versuch 4, der statt des Mehls Stärke enthielt, keine Gährung eintrat, beseitigt meinen Einwand nicht, denn erstens müssen in der Kartoffelstärke nicht dieselben Bacterien vorhanden sein, wie im Mehl, und ferner enthält letzteres Eiweiss, welches nöthig sein könnte, um die Bacterien in den Stand zu setzen, Stärke zu saccharaficiren. Auch für diese Möglichkeit werde ich an anderer Stelle ein Beispiel bringen [1]). Dünnenberger sucht nun zwar wahrscheinlich zu machen, dass im Mehl überhaupt keine stärkelösenden Bacterien vorhanden sind; ich werde aber zeigen, dass das ein Irrthum ist. In der andern Versuchsreihe wurde Mehlteig mit Presshefe inficirt, zum Theil unter Zusatz von Weinsäure. Es trat wiederum Gährung ein. Hier ist eine Mitwirkung von Bacterien durchaus nicht ausgeschlossen. Der Zusatz von Weinsäure bei einem Theil der Versuche bietet keine Garantie für die Unterdrückung der Bacterien, denn es sind doch Bacterien bekannt, welche einen ziemlich hohen Säuregrad ertragen. Hiernach hat Dünnenberger einen correcten Beweis für seine Ansicht, dass die Hefe allein das Aufgehen des Brotteiges bewirke, nicht erbracht,wenn auch nicht zu leugnen ist, dass er dieselbe in hohem Grade wahrscheinlich gemacht hat. Zu tadeln bleibt ferner, dass er die mit *Saccharomyces cerevisiae* erhaltenen Resultate ohne Weiteres auf *Saccharomyces minor*, den Hefepilz des Sauerteigs überträgt. Besonders aber wird man der Behauptung, dass die Bacterien durchaus ohne Bedeutung für die Brotbereitung seien, nicht beipflichten wollen, denn die vermuthlich von ihnen producirten Säuren [1]) beeinflussen den Geschmack des Brotes in hohem Grade und nicht immer zum Nachtheil des säurereicheren, wenn auch ein allzuhoher Säuregehalt, wie man ihn z. B. häufig in dem Schwarzbrot der holsteinischen Bauern findet, wohl als Fehler bezeichnet werden muss.

Endlich ist gewiss auch die peptonisirende Wirkung des Sauerteigs zu beachten, da dieselbe für die Verdaulichkeit des Brotes von Bedeutung sein kann, und es wäre zu untersuchen, ob diese nicht vielleicht von einem Bacterium [2]) besorgt wird.

Dünnenberger setzt etwas Milch- und Essigsäure zu einem Mehlteig, um zu prüfen, ob die von den Bacterien producirten Säuren auf die Consistenz des Klebers einwirken und kommt dabei zu negativen Resultaten. Diese Versuche beweisen natürlich nur die Wirkungslosigkeit jener Säuren, nicht auch die der Bacterien, da diese ja möglicherweise peptonisirend wirken könnten. In der That findet allmählich eine bedeutende Veränderung der Consistenz des Sauerteiges statt, so zwar, dass ein anfangs steifer Teig, wenn man ihn vor zu starkem Wasserverlust schützt, nach mehreren Tagen syrupartig wird, ohne dass dabei Fäulniss eintritt.

In der Schrift: »Das Protoplasma als Fermentorganismus« von A. Wigand findet sich auch ein Abschnitt über Brotgährung. Wigand schreibt dieselbe ebenfalls einem Bacterium zu, welches er mit dem Namen *Bacterium farinaceum* belegt. Da der Verfasser den *Saccharomyces minor* im Sauerteig nicht gesehen hat; — wenigstens erwähnt er dessen Existenz mit keinem Wort — so dürfte derselbe auch in den Versuchsculturen, welche die Wirksamkeit des *Bacterium farinaceum* beweisen sollen, nicht gefehlt haben.

Eine vorläufige Mittheilung über die Brotgährung hat G. Arcangeli veröffentlicht. Dieselbe ist zu kurz gehalten, um eine Kritik der Versuchsanstellung zu ermöglichen. Arcangeli schreibt die Hauptgährung dem *Saccharomyces minor* zu. Ausserdem giebt er an, *Bacillus subtilis* und *Mycoderma vini* im Sauerteig gefunden zu haben. Ersterem schreibt er Stärke- und Eiweisslösung, letzterem Essigbildung zu. Obgleich das Vorkommen des *Bacillus subtilis* im Sauerteig nicht gerade überraschen könnte, habe ich

[1]) Siehe unten Bacillus *E*.

[1]) Siehe darüber unten Bacterium *B* und *C*.

[2]) Siehe Bacillus *E*.

denselben nur einmal ausnahmsweise und auch da nicht mit Sicherheit nachweisen können. Essigsäuregährung ist für *Mycoderma vini*, so viel ich weiss, nicht bekannt, und es dürfte hier wohl eine Verwechslung mit dem *Micrococcus aceti* de By., der ja den älteren Namen *Mycoderma aceti* trägt, vorliegen.

Man wird nach dieser Litteraturübersicht zugeben, dass unsere Kenntniss der Brotgährung noch höchst mangelhaft ist, sodass eine nochmalige Prüfung des Gegenstandes ihre Berechtigung hat.

Die folgende Untersuchung wurde im botanischen Institut unter der Leitung des weiland Herrn Professor de Bary begonnen, nach dessen Tode mit der freundlichen Beihülfe des Herrn Professor Zacharias weitergeführt und im Sommersemester 1888 abgeschlossen.

Es sei mir hier gestattet, diesen meinen verehrten Lehrern, sowie denjenigen Herren, welche mir mit manchem nützlichen Rathschlag zur Seite standen, besonders aber auch meinem geerthen Lehrer, Herrn Professor Rose, der mir die Anleitung zu den nöthigen Analysen gab, meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Ein grosser Mangel der sämmtlichen oben besprochenen Arbeiten liegt darin, dass die Autoren die Herkunft der nachgewiesenen Gährungsproducte auffinden wollen, ohne über eine genaue Kenntniss der normal im Sauerteig vorkommenden Organismen zu verfügen. Mir schien es in erster Linie nothwendig, genau die Flora des Sauerteigs zu untersuchen, weil man ohne die Bekanntschaft mit derselben unmöglich zu einem genauen Verständniss der durch sie hervorgerufenen Wirkungen kommen kann. Der Gang der Untersuchung gestaltete sich daher so, dass zunächst die Organismen des Sauerteigs isolirt, dann behufs Feststellung ihrer Speciescharactere morphologisch geprüft wurden, hierauf ihre Einwirkung auf das Substrat festgestellt und endlich aus den so erkannten Thatsachen eine Erklärung der Brotgährung versucht wurde.

Wenn man Sauerteig mikroskopisch untersucht, so findet man darin als am meisten in die Augen fallende Organismen, stäbchenförmige Bacterien, die sowohl einzeln als auch zu zweien und mehreren verbunden in bedeutender Anzahl darin vorhanden sind. Erst bei etwas genauerer Betrachtung findet man meist ziemlich reichlich *Saccharomyces*-zellen. Diese werden wegen ihrer rundlichen Gestalt leicht mit kleinen Stärkekörnern verwechselt, oder weil der starke Glanz der letzteren unwillkürlich die Aufmerksamkeit auf sie zieht, übersehen. Ich glaube, auf diese Weise erklärt sich Chicandard's Angabe, dass im Sauerteig keine Sprosshefe vorhanden sei. Am besten verwendet man zur Sichtbarmachung der *Saccharomyces*zellen, das von Dünnenberger hierfür empfohlene Anilinwasser-Methylviolett. Man lässt etwas in Wasser aufgerührten Sauerteig auf einem Deckglas eintrocknen, färbt mit obiger Flüssigkeit, spült einen Augenblick in Alcohol ab, wäscht mit Wasser nach, lässt wieder eintrocknen und beobachtet in Canadabalsam. Die Stärkekörner bleiben fast ungefärbt, Bacterien und Sprosspilze treten tief gefärbt hervor. Nach dieser Behandlung bemerkt man stets Sprosshefe in ziemlich reichlicher, wenn auch den Bacterien nachstehender Anzahl. Die sämmtlichen, vorhandenen Saccharomyceten können durch Cultur auf Gelatineplatten[1]) leicht rein erhalten werden. Regelmässig fand ich 3 Formen, zu denen sich in einzelnen Fällen noch eine vierte gesellte.

1. Am reichlichsten lebt im Sauerteig eine kleine Form mit streng oder doch nahezu kugelrunden Zellen, die oft an der Anheftungsstelle der Mutter- oder Tochterzelle etwas abgeplattet sind und im Allgemeinen 3,5 μ Durchmesser haben. Im Hängetropfen, sowie in ruhigstehender Flüssigkeit bildet dieselbe verzweigte Colonien oder kurze einfache Reihen, deren einzelne Glieder ziemlich fest zusammenhängen, sodass, wenn man unter dem Deckglas einen etwas grossen Tropfen mit solchen Colonien hat und nun seitlich mit dem Fliesspapier saugt, man Colonien von 10 und selbst mehr Zellen sich überschlagend über das Gesichtsfeld eilen sieht, ohne dass der Verband zerbrochen wird. In Gelatine bildet sie zunächst kreisrunde, völlig ganzrandige Colonien. Dieselben wachsen später häufig, wenn sie nicht zu tief in der Gelatine stecken, senkrecht aus derselben hervor, bis zu einer Höhe von 1 mm bei einem Durchmesser von $^1/_4$ mm, und biegen sich dann manchmal an der Spitze infolge ihres Gewichtes um. Von den übrigen im Sauerteig vorhandenen Spross-

[1]) 5 % Gelatine, 2—3 % Glykose, etwas Fleischextract und Pepton, neutral oder schwach sauer.

pilzen zeigt nur noch der Folgende diese Eigenschaft, doch pflegen bei diesem die Säulchen bedeutend dicker zu sein. Kahmhautbildung wurde an diesem Sprosspilze nie beobachtet[1]); in alten Culturen in Zuckerlösungen findet man ziemlich häufig einzelne sehr grosse Zellen von einem Durchmesser bis zu 6 μ. Dieselben sind in der Form von den übrigen nicht verschieden und produciren in frische Nährlösung gebracht wieder Zellen von den gewöhnlichen Dimensionen. Auf feuchten Gypsplatten gehalten producirt unser Organismus reichlich Sporen in kugeligen Ascis von etwa 7—8 μ Durchmesser, und zwar meist in der Zweizahl, seltener zu 3 und vier. In Zuckerlösung mit Hefewasser, oder Zuckerlösung mit Pepton oder Malzauszug[2]) bringt der Pilz lebhafte Gährung hervor, als deren Hauptproducte sich Alcohol[3]) und Kohlensäure leicht nachweisen lassen, ausserdem werden sehr geringe Mengen von Säuren gebildet, unter denen Essigsäure[4]) erkannt wurde.

Die Form ist nach den beobachteten Daten mit *Saccharomyces minor* Engel[5]) zu identificiren. Die Merkmale stimmen gut überein, nur kann ich nicht finden, dass die vom *Saccharomyces minor* hervorgerufene Gährung schwach sei, wenn sie auch der des *Saccharomyces cerevisiae* nachsteht.

2. Eine zweite Sprosspilzform ist der vorigen an Grösse ziemlich gleich. Doch sind die Zellen derselben nicht kugelig, sondern eiförmig und haben bei einer Länge von 3—4 μ, eine Breite von 2,5—3 μ. In flüssigen Nährlösungen cultivirt, wachsen sie zu ziemlich grossen, zusammenhängenden, reich verzweigten Colonien aus. In Gelatine werden die bei den ersten Sprossungen selbstverständlich auftretenden Unregelmässigkeiten im Umriss der Colonie ebenso wie bei *Saccharomyces minor* zunächst ausgeglichen, und es bildet sich eine ganzrandige, kreisförmige Colonie. Nach einiger Zeit jedoch, meistens wenn die Colonie einigermaassen herangewachsen ist, treten am Rande derselben einzelne Zellen hervor, und beginnen, in beiläufig radialer Richtung, verzweigte Sprosssysteme auszusenden, sodass nun die Colonie unregelmässig gefranst erscheint. Diese vorspringenden Sprossungen erreichen jedoch immer nur eine im Vergleich zum Radius der Colonie geringe Länge. Uebrigens tritt diese ganze Erscheinung nicht ganz regelmässig auf. Dieser Umstand ist aber nicht etwa darauf zurückzuführen, dass wir es mit zwei verschiedenen Species zu thun haben, denn Aussaaten, mit aller Vorsicht, von Colonien einer Art gemacht, ergaben sowohl ganzrandige, als auch gefranste Colonien. Es scheint diese Verschiedenheit im Verhalten vielmehr von äusseren Umständen abzuhängen, die nicht näher untersucht wurden. Da jedoch der *Saccharomyces minor* stets nur ganzrandige Colonien bildet, so giebt die beschriebene Eigenthümlichkeit dieser Form ein praktisch brauchbares Hülfsmittel zur Isolirung derselben aus einem Gemisch. Dass die Colonien dieses Sprosspilzes zuweilen auch aus der Gelatine hervorwachsen, jedoch in dickeren Säulchen und nicht so hoch wie *Saccharomyces minor*, wurde schon oben erwähnt. In gährfähigen Zuckerlösungen (Malzauszug) bringt auch diese Form eine kräftige, alcoholische Gährung hervor. Der Pilz erwies sich als echter *Saccharomyces* dadurch, dass er in hohem Maasse die Fähigkeit besitzt, Sporen zu bilden. Eine reichliche Menge desselben, die in Malzauszug erzogen war, wurde zunächst durch Auswaschen mit Wasser einigermaassen von Nährlösung befreit und alsdann auf einen Gypsblock gebracht, der feucht gehalten und einer Temperatur von 31—32 ° C. ausgesetzt wurde. Schon nach 17 1/2 Stunden (eher wurde nicht untersucht), fand ich eine reichliche Anzahl von Zellen mit deutlichen Sporenanlagen. Die Sporen treten in der Zahl von 1—4 in den Mutterzellen auf.

Ich möchte die Besprechung dieser beiden gährfähigen Sprosspilze nicht abschliessen, ohne einige Worte über Dünnenberger's Ausführungen über den Verlust der Gährfähigkeit der Hefe bei Gelatinecultur zu sagen. Ich habe von dieser Abschwächung im Allgemeinen nichts bemerken können, nur in ganz vereinzelten Fällen glaubte ich ebenfalls etwas derartiges zu bemerken; doch finden diese wenigen Fälle, wie später bemerkt werden

---

[1]) Die Untersuchung wurde nicht auf die von Hansen entdeckten, spät auftretenden Hautformen ausgedehnt.

[2]) Hergestellt wie folgt: Malz gemahlen und mit Wasser bei 40 ° C. 2 Stunden eingeweicht, dann mehrere Stunden bei 60 ° gehalten, die Flüssigkeit abfiltrirt, neutralisirt, sterilisirt.

[3]) Durch Jodoformreaction, Essigätherreaction, Benzoylchloridreaction.

[4]) Wegen sehr kleiner Mengen wurde nur die Essigäther-, Ferrisalz-, sowie Kakodylreaction ausgeführt.

[5]) Des ferments alcooliques. Thèse. Paris 1872.

wird, vielleicht eine andere Erklärung. Dünnenberger's Versuche liegen wohl hauptsächlich in der ungeeigneten Zusammensetzung seiner Nährlösungen. Traubenzucker mit anorganischen Nährsalzen sind für Hefe doch ein ziemlich mässiger Nährboden. Bei Aussaat kleiner Mengen erhält man kräftige Gährungen nur, wenn man geeignete organische Substanzen zusetzt, nämlich Pepton oder auch nach Pasteur Hefewasser. Dünnenberger vermeidet den Zusatz derartiger Substanzen, weil er sich »von deren Verhalten bei eintretender Gährung keine rechte Vorstellung machen kann«. Man dürfte wohl, ohne zu arg zu irren, annehmen können, dass diese Substanzen der Hefe als Nahrung dienen und zu ihrer kräftigen Entwickelung nothwendig sind, im Uebrigen aber zur Gährung in keiner directen Beziehung stehen. Inwiefern übrigens Dünnenberger sich von dem Verhalten des Asparagin, das er, ebenfalls mit negativem Erfolge als Zusatz verwendet, eine genauere Vorstellung machen kann, ist schwer einzusehen. Das Gelingen der späteren Gährversuche ist jedenfalls grossentheils auf die grössere Aussaatmenge zurückzuführen; ich habe nach der vom Verfasser versprochenen Widerlegung dieser Ansicht vergeblich gesucht. Um übrigens Hefe in Gelatineculturen sicher gährungsfähig zu erhalten, verwendet man sehr zweckmässig statt des Koch'schen Nährgemisches Malzauszug, welcher die nöthige Menge Gelatine zugesetzt wird, eine Culturmethode, die auch von Hansen benutzt worden ist; doch ist dies durchaus nicht nothwendig; in Stichculturen im Reagensglas mit einer Gelatine ernährt, die der von Dünnenberger citirten qualitativ gleich zusammengesetzt war, befanden sich meine Sprosspilze so wohl, dass sie daselbst ziemlich lebhafte Gährung hervorbrachten, wie man an zahlreichen, in der Gelatine auftretenden Luftblasen erkennen konnte. Hier war also von Schwächung der Gährkraft keine Rede. Mir will es nach dem Recept fast scheinen, als sei Dünnenberger's Gelatine etwas alkalisch gewesen, in welchem Falle allerdings die Hefepilze geschädigt werden mussten.

3. Der dritte im Sauerteig regelmässig vorhandene Sprosspilz ist *Mycoderma vini* (*Sacchar. mycoderma*). Doch tritt er in sehr wechselnder Menge auf. In frischem, gutem Sauerteig, der regelmässig durch Zusatz von Mehl aufgefrischt worden ist, findet sich diese Species stets in geringer, manchmal in verschwindend geringer Menge. Wird dagegen Sauerteig, ohne aufgefrischt zu werden, längere Zeit aufbewahrt, so tritt eine bedeutende Vermehrung derselben ein, besonders an der Oberfläche des Teiges in so hohem Grade, dass manchmal die Hauptmenge der vorhandenen Organismen dieser Species angehört. Es ist hiernach ziemlich klar, dass *Mycoderma vini* eine Verunreinigung des Sauerteigs darstellt, die bei guter Arbeit ziemlich vollständig unterdrückt wird, bei nachlässigem Verfahren jedoch überhand nimmt, und dann für den Verlauf der Brotgährung vielleicht von Bedeutung sein kann.

4. Endlich habe ich in einzelnen Fällen auch Hefezellen im Sauerteig gefunden, welche wahrscheinlich zu *Saccharomyces cerevisiae* zu rechnen sind. Dieses Vorkommen ist jedoch durchaus unregelmässig, und es liegt nahe zu vermuthen, dass diese Form entweder durch Zufall in den Sauerteig gerathen, was ja in einer Bäckerei, wo sowohl Brot mit Sauerteig als auch mit Hefe bereitet wird, leicht geschehen kann, oder absichtlich vom Bäcker hinzu gefügt worden sei. Der *Saccharomyces cerevisiae* muss daher für unsere Betrachtungen ausser Acht gelassen werden.

Es ist von einigem Interesse, meine Resultate, betreffend die im Sauerteig vorkommenden Sprosspilze mit denen Boutroux's zu vergleichen. Bezüglich des *Saccharomyces minor* und des *Mycoderma vini* lauten dieselben gleich. Dass in dem von Boutroux untersuchten Sauerteig, wie es scheint, reichliche Quantitäten der letzteren Species sich vorfanden, ist nach dem oben Gesagten leicht verständlich, da derselbe von einer Meierei stammte, wo nur einmal wöchentlich gebacken wurde, und inzwischen, wie aus den etwas unvollständigen Angaben Boutroux's hervorzugehen scheint, ohne aufgefrischt zu werden, aufbewahrt wurde. Auffallen muss dagegen das Vorhandensein einer dem *Saccharomyces cerevisiae* ähnlichen, vielleicht mit ihm identischen Form, wenn man meine Ansicht über den Grund des Vorkommens dieser Species im Sauerteig annehmen will. Immerhin liegt ein directer Widerspruch nicht vor, denn durch Zufall kann auch entfernt von einem Culturherde der Bierhefe einmal *Saccharomyces cerevisiae* in den Sauerteig gelangen, und, wenn die Ver-

hältnisse günstig liegen, sich darin erhalten. Ausser diesen dreien findet nun Boutroux noch eine vierte, dem *Saccharomyces minor* ähnliche Form, der aber die Fähigkeit, Gährung zu erregen, abgeht. Eine solche habe ich im Sauerteig nicht vorgefunden, wenn nicht einige misslungene Gährversuche mit *Saccharomyces minor*, die ich oben als vielleicht zu der von Dünnenberger besprochenen Thatsache gehörig erwähnt habe, auf das Vorhandensein einer solchen Form zurückgeführt werden müssen. Leider habe ich es versäumt, die betreffenden Culturen fortzupflanzen, und später wollte es mir nicht gelingen, eine derartige Form aufzufinden. Jedenfalls erscheint danach diese Form nicht als regelmässiger Bewohner des Sauerteigs.

Endlich habe ich den oben unter 2 beschriebenen Sprosspilz mit grosser Regelmässigkeit im Sauerteig vorgefunden, während Boutroux nichts davon erwähnt. Dass derselbe mit der soeben besprochenen Boutroux'schen Form identisch sein sollte, ist nicht denkbar, denn ich habe nie Hautbildung[1]), dagegen stets lebhafte Gährung in seinen Culturen bemerkt, zwei Umstände, die eine Verwechselung wohl ausschliessen. Vielleicht trägt Boutroux's etwas unvollkommene Trennungsmethode Schuld daran, dass er diese Form nicht gefunden hat.

Ich gehe nun zur Besprechung der den Sauerteig bewohnenden Bacterien über.

Die Untersuchung wurde zunächst unternommen in der Absicht, Laurent's Veröffentlichung über diesen Gegenstand nachzuprüfen; daher war es mein Bestreben, den *Bacillus panificans* aus dem Sauerteig zu isoliren. Dieses ist mir nun nicht gelungen, wenigstens insofern nicht, als ich keinen Bacillus fand, der alle Eigenschaften des *Bacillus panificans* in sich vereinigte, dagegen fand ich verschiedene Bacterien, auf die sich die meisten Eigenschaften dieser Form vertheilen. Ich beginne mit dem Organismus, welcher habituell Laurent's Bacillus am meisten ähnelt, besonders, was die Gelatineculturen betrifft.

Bacterium *A*.

Vermischt man neutrale Koch'sche Nährgelatine mit kleinen Mengen in sterilisirtem Wasser vertheilten Sauerteig, und stellt von der Mischung Plattenculturen her, so findet man unter anderm am zweiten bis dritten Tage kleine, kreisrunde Bacteriencolonien, die im durchgehenden Lichte ein mattgelbbraunes Aussehen haben. Dieselben wachsen sehr langsam und erreichen in Plattenculturen nur sehr geringe Grösse. Bei schwacher Vergrösserung erscheinen sie homogen, bei 100 bis 200facher Vergrösserung zeigen sie eine deutliche Stäbchenstructur. Hebt man eine solche Colonie heraus und zerdrückt sie unter dem Deckglase in Wasser, so findet man sie zusammengesetzt aus sehr kleinen Bacterien von kurz stäbchenförmiger Gestalt, deren Länge etwa das $1^1/_2$fache der Breite beträgt. Dieselben schwärmen einzeln oder höchstens zu zweien verbunden in der Flüssigkeit umher, nur in sehr alten Colonien findet man sie hie und da zu mehreren, fadenartig verbunden und bewegungslos. Stichculturen im Reagensrohr entwickeln sich recht characteristisch. Längs des ganzen Stiches entstehen kugelige Colonien. Das Wachsthum derselben geht auch hier sehr langsam vor sich, doch erreichen sie in sehr alten Culturen (1—2 Monate) etwa Stecknadelkopfgrösse, und zwar werden die Colonien nahe der Oberfläche der Gelatine weder grösser noch kleiner als diejenigen in der Tiefe. Ausbreitung an der Oberfläche findet also nicht statt. Wegen ihrer geringen Grösse berühren sich die Colonien nur, wenn sie sehr gedrängt stehen, auch dann fliessen sie jedoch nie zusammen. Wie aus dem Gesagten schon hervorgeht, wird die Gelatine nicht verflüssigt. Trotz mannigfacher Cultur in verschiedenen Medien und bei verschiedenen Temperaturen ist es mir nie gelungen, von diesem Bacterium Sporen zu erhalten. Ebensowenig gelang es mir an demselben die Fähigkeit Eiweiss oder Stärke zu lösen zu constatiren. Versuche, mit demselben in sterilisirtem Mehl eine Gährung unter Gasproduction zu erhalten, schlugen ebenfalls fehl. Ueber dieselben soll an anderer Stelle Genaueres berichtet werden.

Bacterium *B*.

Ein zweites Bacterium ähnelt in den Plattenculturen dem eben besprochenen zunächst in hohem Grade. Es bildet kreisrunde Colonien von der gleichen Farbe und im Anfange ziemlich der gleichen Grösse. Doch bemerkt man bald ein bedeutend rascheres Wachsthum an diesen Colonien und dieselben erreichen eine bei weitem bedeutendere Grösse als die des Bacterium *A*.

[1]) cf. Fussnote [1]) S. 8.

Bei schwacher Vergrösserung zeigen dieselben nun eine concentrische Schichtung, indem dunklere und hellere Partien abwechseln. Bei stärkerer Vergrösserung erscheinen sie homogener als die des Bacterium *A*. Sind schon in der Plattencultur die Unterschiede nach dem Gesagten deutlich genug, so werden dieselben noch bedeutender in der Stichcultur. Hier wächst diese Form innerhalb der Gelatine fast gar nicht, nur ein schwacher, heller Streif deutet nach mehreren Tagen die Stelle an, wo der Platindraht die Gelatine durchdrungen hatte, dagegen findet eine reichliche Entwickelung statt an der Oberfläche; hier bildet sich bald eine starke, zunächst weisslich gelbe Auflagerung; dieselbe breitet sich nach allen Seiten auf der Gelatine aus und nimmt dabei auch an Dicke zu, sodass sie mehr oder minder die Gestalt einer Halbkugel erhält. In solchen dicken Schichten zeigt die Colonie eine leicht röthliche Färbung. Hiernach ist es klar, dass sich zur Cultur dieses Bacteriums besser die Strichcultur auf der durch Neigen des Reagensrohres schräg erstarrten Gelatine eignet. Es entsteht in solchen Culturen längs des Striches eine wulstige Auflagerung von der erwähnten Färbung.

Die einzelnen Individuen des Bacterium *B* sind ausgesprochen stäbchenförmig; bei einem Durchmesser von 0,4 μ, haben sie eine Länge von etwa 1,5 μ. Aus Gelatineculturen entnommen, findet man sie einzeln oder höchstens zu zweien verbunden, dabei liegen häufig mehrere mit ihren Längsaxen parallel dicht nebeneinander. Hierdurch erhält ein solches Präparat ein recht characteristisches Aussehen, ähnlich der Abbildung, die Flügge in seinem Buch »Die Mikroorganismen« vom Milchsäurebacillus giebt. Die Stäbchen zeigen eine lebhafte, schwärmende Bewegung. In eine neutrale Hefewasser-Zuckerlösung gebracht und bei 30° C. gehalten, erfüllen sie bald die ganze Flüssigkeit mit beweglichen Stäbchen. Nach einiger Zeit entsteht dann an der Oberfläche eine Kahmhaut von schleimiger Beschaffenheit. Dieselbe zeigt die Stäbchen in reichliche Gallertmassen eingebettet, zuerst oft in der oben beschriebenen Anordnung; dann wachsen dieselben zu langen Fäden aus, die sich wirr verschlingen, und die anfangs glatte Haut faltet sich reichlich. Die zunächst fast ungegliedert erscheinenden Fäden lassen allmählich deutlich eine Zusammensetzung aus Stäbchen von den obigen Dimensionen erkennen und diese rücken, wahrscheinlich durch Verquellen von Membranschichten, auseinander. Die Kahmhaut zerfällt dann langsam, ohne dass irgend welche Sporenbildung beobachtet wurde.

Das Bacterium *B* ist, wenn auch in nur sehr geringem Grade, befähigt, Stärke zu lösen. Von vielen in Bezug auf diese Frage in verschiedener Weise angestellten Versuchen, gab der folgende ein positives Resultat: Weizenstärke wurde trocken sterilisirt, nach dem Erkalten mit neutralem Hefewasser übergossen, und dann mit Bacterium *B* inficirt; nach mehreren Wochen zeigte dieselbe einer unveränderten Controllprobe gegenüber geringe Corrosionen. Eiweisslösung konnte an dieser Form nicht constatirt werden. Hingegen bildet sie in Hefewasser-Zuckerlösung merkliche Quantitäten von Säure. Die anfangs neutrale Lösung zeigt bald eine kräftig saure Reaction. Da als im Sauerteig vorkommende Säuren, Essigsäure, Buttersäure und Milchsäure angegeben werden und in den Culturen kein Geruch nach den beiden ersteren auftrat, so war Milchsäure zu vermuthen. Es wurde daher nach dem von Palm angegebenen Verfahren auf Milchsäure geprüft [1]). Die Analyse bestätigte meine Vermuthung; es konnte eine erhebliche Menge Milchsäure nachgewiesen werden. Ueber andere Gährungsversuche mit diesem Bacterium folgt später Genaueres. Zu bemerken ist noch, dass Bacterium *B* mit keinem der bisher bekannten Milchsäurebacterien identisch ist, auch nicht mit dem bekannten Milchsäurebacillus der Milch. Von diesem unterscheidet er sich scharf durch seine Beweglichkeit, die dem ersteren abgeht, ebenso durch Gestalt der Zellen und Kahmhautbildung, während er in Gelatineculturen, wie schon oben erwähnt wurde, eine gewisse habituelle Aehnlichkeit mit ihm hat.

---

[1]) Zeitschrift für analytische Chemie. 1887. 1. Hft. (22. Jahrg. S. 223). Das Gährproduct wird möglichst eingeengt, mit Aether extrahirt, letzterer auf dem Wasserbade abdestillirt, der Rückstand in Wasser gelöst und filtrirt. Zum Filtrat wird alcoholische Bleiessiglösung gefügt (es entstand kein Niederschlag), dann tritt bei Anwesenheit von Milchsäure bei Zusatz von alcoholischen Ammoniak eine Fällung auf $(PbO)_3(C_3H_6O_3)_2$. Hieraus kann die Milchsäure durch Zersetzen mit H_2S, Extrahiren mit Aether und Verdunsten des letzteren rein erhalten werden.

Bacterium *C*.

Dieses Bacterium findet sich besonders in altem starksauren Sauerteig in grosser Menge, doch ist es auch im frischen Teig enthalten und findet sich in den gewöhnlichen Plattenculturen. Es bildet daselbst anfangs kreisrunde Colonien von im durchfallenden Lichte kräftig brauner Farbe und homogenem Aussehen; dieselben treten, wenn sie nahe der Oberfläche liegen, ziemlich hoch aus derselben hervor und zeigen dann grosse Neigung, sich flächenartig auf der Gelatine auszubreiten. Hat man etwas dichte Aussaaten von Bacterium *C* gemacht, so wird häufig die ganze Platte von einem bräunlichen Schleim überzogen. In Stichculturen wächst es wie Bacterium *B* nur auf der Oberfläche einigermaassen kräftig, und breitet sich dort wie dieses nach allen Seiten aus, doch unterscheidet es sich von jenem dadurch, dass es stets nur eine dünne, überall gleich dicke Schicht auf der Gelatine bildet, während Bacterium *B* sich zu wulstigen Auflagerungen entwickelt. Auch bleibt die Farbe stets ein bräunliches Weiss. Der Umriss der Auflagerung erscheint meist etwas gelappt. Strichculturen verhalten sich analog. Das einzelne Individuum des Bacterium *C* stellt sich dar als ein etwa 1,6 μ langes, 0,8 μ breites Körperchen, welches am einen Ende abgestumpft, am andern zugespitzt ist, also etwa eiförmige Gestalt hat. Sowohl in den Gelatine-, als auch in Flüssigkeitsculturen kommen die Individuen entweder einzeln oder zu zweien und nur ausnahmsweise zu vieren verbunden vor. Bei den Zellenpaaren liegen die stumpfen Enden einander selbst zugewendet, dieselben entsprechen also den Stellen, wo die letzte Theilung stattfand. In alten Culturen finden sich häufig Exemplare von blassem Aussehen und etwa den doppelten Dimensionen; dieselben ähneln in ihrem ganzen Habitus den sogenannten Involutionsformen. Bacterium *C* ist stets bewegungslos. In geeigneten Nährflüssigkeiten wird zunächst die ganze Masse gleichmässig getrübt, dann tritt an der Oberfläche ein sehr dünner Schleier auf. Derselbe zeigt schleimige Beschaffenheit und fast keine Festigkeit, zerreisst also bei geringem Schütteln der Flüssigkeit leicht. An den Wänden des Gefässes steigt er bis zu mehr als einem Centimeter über die Flüssigkeit empor. Hieran bemerkt man zuerst, dass überhaupt ein Schleier gebildet worden ist; denn derselbe ist anfangs so dünn, dazu stets vollkommen eben, und das Aussehen seiner Oberfläche gleicht dem der Flüssigkeit anfangs so sehr, dass man ihn beim Betrachten des Flüssigkeitsspiegels von oben vollständig übersieht. Erst wenn man letzteren von unten im total reflectirten Licht beobachtet, erkennt man, dass etwas auf der Oberfläche schwimmt. Hat die Haut nach mehreren Tagen an Dicke etwas zugenommen, so erscheint sie von oben betrachtet als weisslicher, schleimiger Schleier. Uebrigens erreicht sie nie eine irgendwie beträchtliche Dicke.

Die Flüssigkeit bleibt während dessen trübe, und es bildet sich etwas Bodensatz, der ebenfalls aus Bacterien besteht. Da man den Schleier schwer von der Oberfläche der Flüssigkeit entfernen kann, und auch diese von Bacterien erfüllt ist, so gelang es mir nicht, zu constatiren, ob etwa der Bodensatz nur todte Individuen enthielt; doch muss ich hervorheben, dass die Cultur durchaus rein war, woran man vielleicht nach obiger Beschreibung ihres Aussehens zweifeln könnte. Die Nährflüssigkeit dieser Culturen bestand aus Hefewasser mit 5 % Alcohol. Da ich nämlich dieses Bacterium besonders in altem, stark saurem Sauerteige fand, so lag die Vermuthung nahe, dass dasselbe wohl Urheber dieser Säuerung sein möchte. Ich prüfte daher zunächst einmal, ob Bacterium *C* Alcohol in Essigsäure zu verwandeln vermöge. Obige Nährflüssigkeit wurde nun folgendermaassen hergestellt: Neutralisirtes Hefewasser wurde durch Kochen in einer Flasche mit Filtrirpapierverschluss sterilisirt und dann aus einer sterilisirten Pipette soviel absoluter Alcohol, der einen Augenblick aufgekocht war, hinzugefügt, dass der Gehalt an Alcohol 5 % betrug. Eine Controllprobe ohne Infection blieb unverändert, die Culturen jedoch zeigten bald eine stark sauere Reaction. Nicht geöffnete Culturen liess ich vom Tage der Aussaat 8 Tage gähren. Die Flüssigkeit roch dann kräftig nach Essigsäure. Es wurde die Flüssigkeit bis auf einen geringen Rest abdestillirt, aus dem Destillat das Barium- und Silbersalz gewonnen. Dieselben zeigten die Eigenschaften der essigsauren Salze, und ihre Analyse ergab Resultate, die bei Abweichungen von 0,2 bis 1 %, übrigens nach beiden Seiten mit der Theorie für essigsaure Salze übereinstimmten. Hiernach ist Bacterium *C* im Stande, eine kräftige Essigsäuregährung hervorzu-

rufen. Es war daher zu untersuchen, ob es mit dem bekannten Erreger der Essiggährung, dem *Micrococcus aceti* de By. übereinstimme. Das ist nach einem Vergleich obiger Beschreibung des Bacterium *C* mit den Diagnosen des *Micrococcus aceti* nicht der Fall. Da jedoch diese Diagnosen nicht ganz vollkommene Uebereinstimmung zeigen, so verglich ich 2 Parallelculturen auf gleichem Nährboden, nämlich auf Bier. Dabei ergaben sich folgende Unterschiede:

Bei ziemlich gleicher Länge[1]) ist Bacterium *C* bedeutend schlanker als *Micrococcus aceti*. Letzterer ist an beiden Enden stumpf, ersteres an einem Ende zugespitzt. Die Kahmhaut des *Micrococcus aceti* hat eine trockene, lederartig glänzende Oberfläche, sie ist reich gefaltet, die Falten stehen senkrecht zum Flüssigkeitsspiegel; der Schleier des Bacterium *C.* erscheint schleimig feucht, seine wenigen Falten liegen parallel zur Fläche. Die Zellen des gewöhnlichen Essigbacterium bleiben häufig zu langen Fäden vereinigt, die des Bacterium *C* findet man nur ausnahmsweise zu mehr als zwei. Duclaux giebt in seiner Mikrobiologie auf S. 504—505 eine kurze Beschreibung eines Essigbacterium, die, wenn ich sie recht verstehe, einigermaassen auf Bacterium *C* passt. Ich möchte nicht unterlassen zu bemerken, dass ich in den Häuten des *Micrococcus aceti* vereinzelte Zellen fand, die dem Bacterium *C* ähnelten, sodass möglicherweise dasselbe auch in der gewöhnlichen Essighaut vorkommt.

Die alcoholische Nährflüssigkeit sagt dem Bacterium *C* recht gut zu. Für andere Organismen ist sie dagegen begreiflicherweise ein ziemlich mässiges Substrat. Man erhält daher am einfachsten eine fast reine Cultur dieses Bacterium, wenn man in die wie oben bereitete Flüssigkeit etwas alten Sauerteig bringt. Es tritt unter starker Säuerung der Flüssigkeit der oben beschriebene Schleier auf. Derselbe besteht meistens ausschliesslich aus dem in Rede stehenden Organismus.

Bacillus *D*.

In den Gelatineplatten findet man, ausser den bis jetzt beschriebenen, Colonien in Farbe und Grösse denen des Bacterium *A* so gut wie vollständig gleich, doch verschieden dadurch, dass sie nicht wie jene eine vollkommen kreisrunde Gestalt haben, sondern etwas länglich und meistens an einer Stelle des Umfangs einen scharf einspringenden Winkel zeigen, so dass die Colonie gekrümmt erscheint, etwa die Gestalt eines Mehlsackes besitzt, den man quer auf eine scharfe Kante gelegt hat. Bei fortgesetzter Cultur erhält sich dieser Character constant, während die Colonien des Bacterium *A* diese Gestalt nie zeigen. Unter dem Deckglas zerdrückt findet man die Colonien zusammengesetzt aus langen, etwa 0,5 μ dicken Fäden, welche wirr durcheinander geschlungen sind, sodass sie durch Druck auf das Deckglas und seitliches Verschieben desselben nur schwierig oder gar nicht von einander zu trennen sind. Dieses Verhalten zeigen besonders ältere Colonien, während jüngere aus kürzeren, weniger fest zusammenhängenden Stücken bestehen, welche, wenn sie in Flüssigkeit gelangen, mehr oder weniger lebhafte Bewegung zeigen. Besonders in der ersten Cultur aus dem Sauerteig findet man auch häufig Colonien, die aus einer Reihe der oben beschriebenen zusammengesetzt erscheinen und in ihrer Gestalt nicht unpassend mit einer mehrfach unvollkommen abgeschnürten Wurst verglichen werden können. Diese Gestalt kommt dadurch zu Stande, dass die einzelnen Glieder eines längern Fadens — solche finden sich im Sauerteig häufig — jedes für sich zu einer Colonien auswachsen und durch Zusammendrängung derselben die obige Gestalt zu Stande bringen. Das Wachsthum des Bacillus *D* in den Gelatineplatten geht sehr langsam vor sich und scheint beschränkt, die Colonien werden dem blossen Auge eben sichtbar. Ich übertrug daher den Bacillus auf Nähragarplatten, welche bei einer Temperatur von 30 ° C. gehalten wurden. Hier bilden sich zunächst einigermassen rundliche Colonien. Bald jedoch wird der Umfang derselben unregelmässig, indem einzelne Individuen am Rande hervortreten und nun zu langen Fäden auswachsen, nach allen Richtungen das Substrat durchkreuzend. War die Cultur etwas dicht gesäet, so ist bald kein Flächentheil des Substrates mehr frei von Bacterien. Gelangen dieselben an die Oberfläche, so breiten sie sich auf derselben aus und überziehen sie mit einer gleichmässig dicken, weissen, feuchtglänzenden Schicht. Nach einigen Tagen tritt überall reichliche Sporenbildung ein. In der Gelatinestich-

[1]) Die Länge der einzelnen Zellen scheint mir mit 3 μ für *Micrococcus aceti* in der Kryptogamenflora von Schlesien etwas zu gross angegeben.

cultur gleicht Bacillus *D* dem Bacterium *A* anfangs vollständig. Längs des Striches entstehen isolirte, kugelige Colonien von überall gleicher Grösse. Ausbreitung an der Oberfläche findet nicht statt. Bei sehr langer Cultur (nach mehreren Wochen) senden aber die Colonien nach allen Richtungen reiche Auszweigungen in die umgebende Gelatine, so dass das Ganze etwa das Aussehen einer kleinen Flaschenbürste erhält.

Bringt man eine Spur des Bacillus *D* in eine mit Bierwürze beschicktes und mit Watte verschlossenes Erlenmeier'sches Kölbchen, und hält dasselbe bei etwa 30° C., so findet man nach 1—2 Tagen die Flüssigkeit von lebhaft beweglichen Stäbchen von etwa 0,5 μ Breite und 2—3 μ Länge erfüllt. Nach 3—4 Tagen (von der Aussaat gerechnet) treten auf der Oberfläche der Flüssigkeit kleine Inselchen auf. Dieselben erscheinen zunächst feucht, bald aber erhalten sie ein trockenes, weisses Aussehen, so dass man sie bei flüchtiger Betrachtung mit kleinen Schimmelvegetationen verwechseln kann. Sie bestehen aus einem wirren Geflecht gegliederter, langer, unbeweglicher Fäden, zwischen denen zunächst noch reichlich bewegliche Stäbchen, theils einzeln, theils zu mehreren bis vielen vereinigt, umherschwärmen. Während sich nun die Zahl der Inselchen vermehrt, treten dieselben durch Wachsthum und Verschlingung der Fäden in seitliche Verbindung mit einander, und die ganze Flüssigkeit wird von einer Kahmhaut bedeckt. Dieselbe besitzt eine sehr unregelmässig gefaltete Oberfläche. Während die meisten Kahmhäute Falten von beträchtlicher Längenausdehnung zeigen, und bei ihrem Flächenwachsthum durch Raummangel zusammengeschoben erscheinen, findet man hier Erhöhungen und Vertiefungen von rundlichem Umriss. Dieselben kommen dadurch zu Stande, dass die Fäden, welche das seitliche Verwachsen der Inselchen bewirken, etwas in die Flüssigkeit hinabhängen und so unterhalb der Oberfläche sich verschlingen. Infolgedessen findet man auch in den Vertiefungen der Kahmhaut zahlreiche, kleine Tropfen von Nährflüssigkeit. Die Kahmhaut zeigte in diesem Zustande, obgleich ihre Dicke nur etwa 0,5 mm beträgt, eine grosse Zugfestigkeit. Bei dem Versuch mit einem hakenförmig gebogenen Platindraht ein Stückchen zur mikroskopischen Untersuchung herauszureissen, hebt man gewöhnlich die ganze Haut von der Flüssigkeit ab, ohne dass dieselbe zerreisst. Der Grund hiervon ist in der oben erwähnten dichten Verschlingung der Fäden zu suchen. Gallertmassen konnten nicht nachgewiesen werden. Es beginnt nun die endogene Sporenbildung. Dieselbe schreitet sehr langsam fort und erstreckt sich meist nur auf einen Theil der Zellen. Wegen dieses Umstandes, sowie wegen der ziemlich geringen Grösse, besonders der Breite der sporenbildenden Zellen, stösst eine genauere Untersuchung dieses Vorganges auf grosse Schwierigkeiten; er wurde daher nicht in die Einzelheiten verfolgt. Bevor die Sporen auftreten, werden die Trennungswände der einzelnen Zellen, die vorher nur mit Hülfe von Reagentien (Jod in Alcohol) zu erkennen sind, deutlich sichtbar. Die Dimensionen und die Gestalt der Sporenmutterzellen stimmen mit denen der schwärmenden Stäbchen überein. Die reifen Sporen haben eine Länge von etwa 1,4 μ, und eine Breite von nicht ganz 0,5 μ, sind also ziemlich lang und stäbchenförmig. Sie liegen in der Mitte der Mutterzellen. Im Aequator erscheinen sie etwas eingeschnürt, doch ergiebt sich dies bei genauerer Betrachtung als eine Täuschung. Die stark lichtbrechende Substanz in den Sporen ist nämlich an den Polen gelagert und hat am Aequator eine kurze Einschnürung oder selbst Unterbrechung; dadurch wird an dieser Stelle die Spore blasser, und die blasse Zone zwischen den beiden glänzenden Enden bringt den Eindruck einer Einschnürung hervor. Wenn die Sporen ihre volle Reife erreicht haben, verschwinden die Membranen der Mutterzellen allmählich, die Kahmhaut verliert nach und nach ihre Festigkeit, schliesslich fallen die Sporen zu Boden und bilden dort eine schmutzig weisse Ansammlung.

Die Keimung wurde im Hängetropfen beobachtet. Die Sporen schwellen zunächst etwas an und verlieren ihren starken Glanz, dabei wird die Membran als deutliche schwarze Contour von dem Inhalte unterscheidbar.

Sie hat an beiden Enden eine etwas grössere Dicke als am Aequator. Nachdem die Sporen in diesem Zustande längere Zeit unverändert verharrt haben, reisst die Membran am Aequator auf, und das junge Stäbchen tritt senkrecht zur Längsaxe der Spore hervor. Dasselbe wächst rasch in die Länge, ohne dass dabei zunächst deutlich sichtbare Theilungen auftreten. Während dessen

schlüpft der junge Bacillus früher oder später aus der Sporenmembran. Dies geschieht manchmal kurz nach dem Aufspringen der letzteren, manchmal erst, wenn das kurze Stäbchen schon zu einem ziemlich langen Faden ausgewachsen ist. Nach einiger Zeit tritt nun eine deutliche Trennung des Fadens in Stäbchen von den oben angegebenen Dimensionen ein. Das Ganze beginnt eine schlängelnde, bald mit Ortsveränderung verbundene Bewegung, und dabei werden nach kurzer Zeit die einzelnen Stäbchen isolirt und schwärmen davon. Zur weiteren Cultur des Bacillus *D* ist die Hängetropfencultur wenig geeignet; das Schwärmen hörte nach 1—2 Tagen auf und es wurden vereinzelte Sporen gebildet, ohne dass jedoch die Stäbchen regelmässig zu langen Fäden auswachsen. Die meisten Individuen gingen nach einiger Zeit zu Grunde, ohne zur Sporenbildung gelangt zu sein.

Nach dem hier beschriebenen Entwickelungsgang steht Bacillus *D* dem *Bacillus subtilis* sehr nahe. Die ähnlichen Punkte sind die Sporenkeimung, Schwärmzustand, Auswachsen zu langen, unbeweglichen Fäden und Sporenbildung in diesem Zustande. Unterschieden ist der Bacillus *D* von *Bacillus subtilis* jedoch durch geringere Dimensionen der Stäbchen und geringere Breite der Sporen, sowie durch das oben beschriebene eigenthümliche Aussehen der letzteren. Endlich ist unser Bacillus nicht im Stande, Gelatine zu verflüssigen.

Von bemerkenswerthen physiologischen Eigenschaften konnte ich an ihm die Fähigkeit, Stärke zu lösen, nachweisen. Culturen, die ebenso wie die für Bacterium *B* beschriebenen, eingerichtet wurden, zeigten schon am zweiten Tage eine kräftige Corrosion der Stärkekörner.

Bacillus *E*.

Die Sporen dieses Bacillus haben eine Länge von etwa 1,6 und eine Breite von 0,8 μ. Sie besitzen das gewöhnliche starke Lichtbrechungsvermögen der Bacteriensporen. Im Hängetropfen aus einer geeigneten Flüssigkeit bestehend bei 30° C. gehalten, beginnen die Sporen bald anzuschwellen, wobei sie ihren starken Glanz vollkommen verlieren. Man sieht jetzt deutlich eine doppelt contourirte, ziemlich dicke Membran gegen das Innere abgegrenzt. Wenn die Spore etwa das $1^1/_2$fache ihrer ursprünglichen Länge erreicht hat, tritt an einem vorher nicht zu unterscheidenden Ende eine kleine Papille hervor, und bei genauer Betrachtung zeigt sich, dass die Sporenmembran in eine äussere dicke und eine innere dünne getrennt ist; erstere ist am besagten Ende aufgerissen, während die letztere sich in Gestalt jener Papille vorgewölbt hat. Diese nimmt nun rasch an Grösse zu und erhält die Gestalt eines kurzen Cylinders mit abgerundetem Ende. Zugleich wird am entgegengesetzten Ende die Trennung der äusseren Membran von der inneren sichtbar, und es liegt nun ein kurzes Stäbchen frei in der alten Sporenmembran; nur wo diese aufgerissen ist, liegt sie demselben fest an. Das Stäbchen rückt nun langsam aus der Membran hervor, bis etwa nur noch ein Viertel seiner Länge darin steckt, dann wird es mit einem Ruck herausgeschnellt und liegt nun frei in der Flüssigkeit. Es beginnt nach kurzer Ruhezeit zu schwärmen und sich durch Zweitheilung zu vermehren. Die Theilstücke können entweder längere Zeit vereinigt bleiben, oder sie trennen sich bald nach der Theilung. Das letztere geschieht besonders im Anfang der Vegetation, so lange noch wenig Stäbchen im Hängetropfen vorhanden sind, später bilden sich oft sehr lange Ketten, die wie Schlangen sich hin und her schlängelnd fortschreiten. Nach etwa 24 Stunden hört die Schwärmbewegung auf. Die Stäbchen wachsen nun zu langen Fäden aus, welche sich theils schön parallel ordnen, theils wirr durcheinanderschlingen. Ersteres schien mir besonders bei reichlicher Ernährung einzutreten, während letzteres in weniger gut gehaltenen Culturen der Fall war; dann fiel auch die nun beginnende Sporenbildung etwas weniger reichlich aus. Die langen Fäden zeigen zunächst keine deutliche Gliederung in Stäbchen, doch ist dieselbe mit guten starken Systemen erkennbar und auch durch Jod in Alcohol leicht hervorzuheben. Ihr Plasma erscheint vollkommen hyalin.

Zunächst tritt nun die Gliederung in Stäbchen deutlich hervor, darauf erscheinen in dem Plasma feine Körnchen in grosser Zahl. Nun bemerkt man, einem Ende des Stäbchens genähert, eine Plasmabrücke, die sich von dem übrigen Inhalt des Stäbchens, ausgenommen den Körnchen, durch etwas stärkeres Lichtbrechungsvermögen unterscheidet, endlich erscheint an der Stelle dieser Plasmabrücke, zunächst noch schwach umschrieben,

die Spore, und zwar sogleich in der endgültigen Grösse. In diesem Punkte scheint also Bacillus *E* von den bisher genauer beschriebenen, endosporen Bacterien verschieden zu sein, denn soweit überhaupt die Sporenbildung genauer beobachtet wurde, geben die Autoren stets an, dass zunächst ein kleineres, stark lichtbrechendes Körnchen auftritt, welches sich dann unter Vergrösserung zur Spore umbildet. Einen solchen Vorgang habe ich bei Bacillus *E* nicht entdecken können, vielmehr beobachtete ich stets das beschriebene Verhalten.

Die Sporenanlage nimmt an Glanz zu und erlangt das bekannte Aussehen der Bacteriensporen. Hierauf wird die Membran des Stäbchens allmählich blasser und verschwindet endlich, die Sporen und die gleich zu beschreibenden Körnchen verharren jedoch in ihrer gegenseitigen Lage, sodass man bei reichlicher Sporenbildung lange Reihen glänzender Kügelchen und Ovale erhält. Es ist dies wohl ein Zeichen, dass die verquellenden Membranen wenigstens zunächst einen ziemlich consistenten Schleim hinterlassen.

Fast regelmässig zugleich mit dem ersten Auftreten der Spore, vielleicht schon hier und da etwas früher, erscheinen unter den feinen Körnchen des Plasmas ein oder mehrere grössere an dem der Spore entgegengesetzten Ende des Stäbchens. Während nun die Spore an Glanz zunimmt, thun sie dasselbe, und schliesslich findet man in dem blass erscheinenden Stäbchen, die stark glänzende, ovale Spore und ein oder mehrere ebenso glänzende, jedoch stets kugelrunde Körnchen, die zuweilen, besonders wenn nur eines vorhanden ist, der Spore wenig an Grösse nachgeben. Da nun ziemlich häufig nur ein solches grosses Körnchen gebildet wird, so schien es mir nöthig, zu untersuchen, ob demselben nicht auch etwa Sporenqualität zukomme. Zahlreiche Beobachtungen haben jedoch ergeben, dass dieselben nicht keimfähig sind. Wenn die Spore desselben Stäbchens schon längst den jungen Bacillus entlassen hat, liegt das runde Körnchen noch immer gänzlich unverändert da.

Ich muss hier bemerken, dass das Auswachsen zu langen Fäden nicht durchaus nothwendige Vorbedingung der Sporenbildung ist. In meinen Culturen fand ich vielmehr häufig einzelne, auch räumlich von den langen Fäden getrennte Stäbchen, die also nicht wohl von jenen abgebrochen sein konnten, mit gut ausgebildeten Sporen. Da diese Art der Sporenbildung besonders am Rand des Tropfens eintrat, wo die Ernährung bei der angewandten Culturmethode [1]) vermuthlich schlechter war als in der Mitte, und da diese Erscheinung besonders reichlich in Culturen auftrat, die schlecht ernährt waren, so ist es wahrscheinlich, dass diese Abweichung vom regelmässigen Entwickelungsgang durch ungünstige, äussere Bedingungen hervorgebracht wird.

Die Beobachtungen des Entwickelungsganges wurden, wie erwähnt, an Culturen im Hängetropfen ausgeführt. Als Nährmaterial wurde ein Aufguss von gekochtem Hühnereiweiss benutzt, in dem sich kleine Stückchen festes Eiweiss befanden. Diese Ernährungsweise scheint dem Bacillus besonders zuzusagen, denn die Vegetation in diesen Culturen ist eine äusserst kräftige, sodass manchmal nahezu alle Stäbchen Sporen bilden. Bezüglich der Cultur dieser Species in anderen Substraten ist folgendes zu bemerken. In der gewöhnlichen, neutralen Zucker-Pepton-Fleischextract-Gelatine wächst dieselbe fast gar nicht. Es ist mir nie gelungen, in Plattenculturen eine Colonie zu erziehen. In einer Stichcultur im Reagensröhrchen erwuchs einmal eine ziemlich kümmerliche Vegetation, wobei die Gelatine langsam verflüssigt wurde. Dagegen findet ein rapides Wachsthum mit schneller Verflüssigung der Gelatine statt, wenn man dem Nährboden statt Zucker »lösliche Stärke« [2]) zusetzt. Die jungen Colonien zeigen die Stäbchen im Allgemeinen parallel zu einander und in der Richtung des Umrisses der Colonie gelagert. Sehr bald beginnt aber die Verflüssigung der Gelatine, und sobald das geschieht, greift allmählich eine ganz andere Anordnung Platz. In der Mitte der Colonie liegt ein Haufen wirr durch einander geschlungener, langer Fäden, meist bewegungslos, zwischen ihm und der Peripherie findet man Stäbchen einzeln und zu Ketten vereinigt in oft sehr lebhafter Bewegung, endlich am Rande der Colonie, d. h. am Rande des Areals verflüs-

[1]) Siehe unten.

[2]) Hergestellt nach dem in Roscoe und Schorlemmer, Lehrbuch der Chemie, 1884, Bd. III. S. 113 angegebenen Verfahren.

Vergl. auch Beilstein, Handbuch der organischen Chemie. S. 592.

Uebrigens ist hier die wirkliche chemische Natur der Präparate gleichgültig, es kam nur darauf an, ein passendes Nährmaterial zu haben.

sigter Gelatine, etwas in den noch festen Nährboden vorgeschoben, ordnen sich sehr zahlreiche, meist einzelne Stäbchen, alle genau normal zur Grenzlinie zwischen flüssiger und fester Gelatine stehend, zu einem dichten Kranze an. Die Verflüssigung der Gelatine schreitet nun rapid fort, so dass 3—4 Tage nach der Aussaat meist die ganze Gelatine verflüssigt ist. Die Bewegung der Bacterien wird allmählich träger, es bilden sich lange unbewegliche Fäden, die sich zu einer auf der Flüssigkeit schwimmenden Haut vereinigen. Sporenbildung tritt in diesen Culturen bei Zimmertemperatur spärlich oder gar nicht ein. Um Sporen in grösserer Menge zu erhalten, wurde der Bacillus in Erlenmeier'schen Kölbchen, die mit neutralisirtem Hefewasser beschickt waren, bei 30° C. cultivirt. Hier tritt einige Tage nach der Aussaat von Stäbchen auf der Oberfläche eine schleimige, etwas runzlige Haut auf. Sie besteht aus wirr verschlungenen Fäden, selten zeigt sich an einigen Stellen parallele Anordnung derselben; es werden ziemlich reichlich Sporen gebildet, worauf die Haut zerfällt, und die Sporen zu Boden sinken.

Als Gährungserreger hat Bacillus *E* in den ihm gebotenen Nährmedien nie gewirkt, dagegen ist er im Stande, kräftige, enzymatische Wirkungen hervorzubringen. Die lebhafte Verflüssigung der Gelatine in den Culturen veranlasste mich zunächst zu prüfen, ob dieses Bacterium im Stande sei, Eiweiss zu lösen. Zu diesem Zwecke wurden zuerst die oben beschriebenen Hängetropfenculturen eingerichtet. Bringt man nun in einen solchen Tropfen ein wenig gekochtes Hühnereiweiss, so viel, dass man es gerade noch mit blossem Auge gut sehen kann, neben einer nicht zu kleinen Anzahl der Stäbchen, und hält die Cultur bei etwa 30° C., so sammeln sie sich bald um das Nährmaterial an und umschwärmen dasselbe in lebhafter Bewegung. Nach einiger Zeit (1—2 Stunden) werden die Umrisse des Eiweissstückchens verschwommen, dasselbe scheint seine Consistenz zu verlieren, denn man sieht die Stäbchen sich durch dasselbe bewegen, allmählich wird es blasser und blasser, und verschwindet in exquisiten Fällen vollkommen, je nach seiner Grösse nach verschieden langer Zeit. Stellt man den Versuch in grösseren Dimensionen an, so zeigt die Flüssigkeit nach einiger Zeit kräftige Peptonreaction.

Es wurde nun ferner geprüft, ob Bacillus *E* im Stande sei, Stärke zu lösen. Zu dem Zwecke wurden Culturen eingerichtet, wie sie für Bacterium *B* beschrieben wurden. Nach einigen Tagen zeigten die Stärkekörnchen starke Corrosionen. Nimmt man zu diesen Culturen statt des Hefewassers ein neutrales Nährsalzgemisch, so findet nur eine kümmerliche Vegetation statt, und von Corrosion der Stärkekörner ist nichts zu bemerken.

Es fragt sich nun, ob diese Form mit irgend einer bisher beschriebenen zu identificiren ist. Zunächst steht unzweifelhaft auch Bacillus *E* dem *Bacillus subtilis* ziemlich nahe, denn die allgemeinen Charactere ihres Entwickelungsganges stimmen überein. Doch sind dieselben zunächst durch ihre Grösse unterschieden. Die Zellen des *Bacillus subtilis* haben eine Breite von 0,5 μ bei einer Länge von 1,5—4 μ, die des Bacillus *E* eine Breite von etwa 1,2 μ bei einer Länge von 3—5 μ; die Sporen des ersteren sind 1,2 lang und 0,6 μ breit, die des letzteren 0,6 μ lang und 0,8 μ breit. Ferner geht die Sporenkeimung verschieden vor sich. Bei *Bacillus subtilis* zerreisst die Sporenmembran am Aequator, bei Bacillus *E* an einem Pol.

Auch mit *Bacillus Ulna* Cohn fällt unsere Form nicht zusammen, und zwar ist hier besonders die weit bedeutendere Grösse des ersteren entscheidend. Seine Stäbchen sind nach Prazmowski 1,5—2,2 μ breit und mindestens 3 μ lang, die Sporen sind über 1 μ breit und 2,5—2,8 μ lang, sonst hat dieser Bacillus mit unserm Bacillus *E* viel Aehnlichkeit, unter anderem auch die Vorliebe für Eiweissnahrung, doch soll er nach dem genannten Autor gekochtes Hühnereiweiss nicht angreifen. Da andere Species nicht in Betracht kommen, so ist Bacillus *E* als neue Form anzusehen.

Es erübrigt noch, über das Vorkommen dieses Bacillus im Sauerteig etwas zu sagen. Man findet ihn nicht leicht auf, und ich habe ihn lange übersehen. Zwar sieht man die grossen Stäbchen im Sauerteig häufig genug, aber sie zu isoliren, gelingt ziemlich schwer. Eine grössere Menge erhielt ich zuerst, als ich einmal eine kleine Portion Sauerteig mit etwas Wasser angerührt, auf einen Objectträger in der feuchten Kammer stehen liess; hier war natürlich Infection von aussen möglich. In einwurfsfreier Weise wird er aus dem

Sauerteig durch Aussäen desselben in Stärkegelatine erzogen. Mit Sicherheit erhält man ihn auch, wenn man etwas Weizenmehl in ein mit sterilisirtem Hefewasser beschicktes, steriles Erlenmeier'sches Kölbchen bringt und das Gefäss bei 30° stehen lässt.

Es entwickelt sich eine grosse Menge verschiedener Bacterien, unter diesen immer unser Bacillus. Er bildet bald Sporen, und da diese ein kurzes Aufkochen gut vertragen, so gelingt es ziemlich leicht, ihn zu isoliren [1]).

Meinen Untersuchungen gegenüber muss es Wunder nehmen, dass Laurent als constanten Bewohner des Sauerteiges nur einen Bacillus aufführt. Freilich ist aus seinen kurzen Angaben nicht mit Sicherheit zu erkennen, ob er nicht auch noch andere regelmässig vorfand, jedenfalls hat er nur diesen einen berücksichtigt. Nun stimmt aber sein *Bacillus panificans* mit keinem der von mir gefundenen Bacterien völlig überein, jedoch finden sich seine Charactere im Wesentlichen vertheilt auf Bacterium *A* und *B* oder *C*, und den Bacillus *D* vor. Da nun, wie ich bemerkt habe, die jungen Colonien der drei ersten Formen wohl verwechselt werden können, so kann ich die Vermuthung nicht ganz von mir weisen, dass Laurent keine reinen Culturen vor sich gehabt hat. Besonders die Beschreibung der Stichcultur macht diesen Gedanken wahrscheinlich. Laurent sagt nämlich, dass sich innerhalb der Gelatine eine Reihe einzelner Colonien entwickelt, während sich auf der Oberfläche eine gelappte Auflagerung ausbreitet. Man sieht, dass genau dasselbe entstehen müsste, wenn man ein Gemisch von Bacterium *A* und *B* oder *A* und *C* in die Stichcultur bringt. *A* würde die Reihe von Colonien in der Gelatine geben und das minimale Wachsthum von *B* oder *C* dort verdecken, *B* oder *C* würde die grosse Colonie auf der Oberfläche ergeben.

Bacillus *D* endlich könnte sehr lange in der Cultur vorhanden sein, ohne dass seine Anwesenheit entdeckt würde, denn, wie ich bemerkt habe, tritt sein characteristisches Verhalten in der Stichcultur erst sehr spät hervor; mit diesem aber stimmt Laurent's *Bacillus panificans* in der Sporenbildung einigermaassen überein. Aus Laurent's Angaben über Eiweiss- und Stärkelösung durch seinen Bacillus ist nichts über die Versuchsanstellung zu ersehen, und da gerade die Sterilisation von Stärke- oder Mehlkleister nicht leicht zu erreichen ist, so glaube ich nicht, diese Notizen ohne Weiteres zu einer Diagnose des *Bacillus panificans* verwenden zu können.

Die Reihe von Organismen, welche ich als regelmässige Bewohner des Sauerteiges nachweisen konnte, ist hiermit abgeschlossen. Es erübrigt nun zu prüfen, inwieweit mit diesem Material die Brotgährung erklärt werden kann.

Für die Producenten des im Sauerteig nachgewiesenen Alcohols wird man natürlich die gährfähigen *Saccharomyces*formen in Anspruch nehmen. Da im Mehl Zucker als vorhanden angegeben wird, wenn auch nicht ganz ohne Widerspruch [1]), so hat jene Annahme einen hohen Grad von Wahrscheinlichkeit für sich; doch lag mir daran, einwurfsfrei festzustellen, ob jene *Saccharomyces*arten im Mehle ohne jede Beihülfe von Bacterien, Alcoholgährung hervorrufen könnten. Dies war nur möglich, wenn es gelang, das Mehl, ohne zu grosse Veränderungen in demselben hervorzubringen, zu sterilisiren. Dies durch Kochen mit Wasser zu erreichen, hat grosse Unbequemlichkeiten, ich griff daher zur trockenen Erhitzung. Hier konnte nun aber eine zu hohe Erwärmung Veränderungen hervorrufen, während andererseits die Temperatur doch 100° C. übersteigen musste, um alle vorhandenen Keime zu tödten. Ich gelangte schliesslich zu meinem Zweck dadurch, dass ich Erlenmeier'sche Kölbchen mit je 10 g Mehl beschickte, mit Watte verschloss und dieselben nun in einem Paraffinbad 24 Stunden einer Temperatur von 115—120° C. aussetzte. Das Mehl zeigt sich nach dieser Procedur in seiner Farbe meistens unverändert, nur in einzelnen Fällen ein wenig gelblich gefärbt. Es wurde nun nach Entfernen des Watteverschlusses sterilisirtes Wasser hinzugebracht, und zwar, um die Verhältnisse im Sauerteig möglichst nachzuahmen, nur soviel, dass das Mehl eben gut durchfeuchtet war; ein eigentlicher zäher Teig bildet sich aus dem erhitzten Mehl nicht. Hierauf inficirte ich mit einer Spur von einer der beiden *Saccharomyces*arten und

[1]) Hiermit ist zugleich der oben versprochene Beweis erbracht, dass im Mehl stärkelösende Bacterien vorhanden sind.

[1]) cf. Alex. v. Asbóth, Enthalten die Getreidearten Zucker? Chemiker-Zeitung. 12. 25—26. 4/1.

versah darauf die Flaschen mit einer Vorrichtung zum Auffangen entweichender Gase. Die so hergerichteten Culturen wurden einer Temperatur von 30 ° C. ausgesetzt, und unter Vorsichtsmassregeln, welche den Einfluss von Temperaturschwankungen ausschliessen, wurde das sich entwickelnde Gas aufgefangen. Es trat nun ausser in den vereinzelten, schon oben erwähnten Fällen, stets Gährung ein. Nach Beendigung derselben wurden die Culturen auf ihre Reinheit geprüft. Nach dem beschriebenen, etwas unvollkommenen Verfahren ist es selbstverständlich, dass hier und da Verunreinigungen hineingerathen waren, ich habe daher eine grössere Anzahl von Versuchen gemacht, um das Resultat sicherzustellen.

Im vergohrenen Mehl konnte ich stets Alcohol nachweisen. Obgleich es nun sehr unwahrscheinlich war, dass durch das Erhitzen im Mehl gährfähige Kohlehydrate entstanden seien, da Stärke sich erst bei 180 ° in Dextrin verwandeln soll, so stellte ich doch folgenden Controllversuch an. Weizenstärke wurde in der gleichen Weise sterilisirt, wie das Mehl der Hauptversuche, hierauf mit sterilisirtem Hefewasser übergossen und mit *Saccharomyces minor* inficirt: es trat keine Gährung ein, obgleich der *Saccharomyces* gut gewachsen war. Hierdurch ist erwiesen, dass das Kohlehydrat nicht etwa bei der Sterilisation erzeugt wurde, denn wenn in obiger Nährlösung Zucker vorhanden gewesen wäre, so würde sicher Gährung eingetreten sein, da Zucker mit Hefewasser für Hefe eine ausgezeichnete Gährflüssigkeit ist. Es ist nicht wohl denkbar, dass bei der Sterilisation die Eiweissstoffe des Mehles in einem der Gährung günstigen Sinne beeinflusst worden wären, auch ist ja im Mehl von vornherein lösliches Eiweiss vorhanden, das der Hefe zur Verfügung steht. Mithin dürfte die Frage, ob die beiden *Saccharomyces*species des Sauerteigs für sich im Mehl alcoholische Gährung hervorbringen können, im bejahenden Sinne zu beantworten sein. Einiges Interesse bietet der Vergleich dieses Resultats mit den Angaben über das Vorhandensein vom Zucker im Mehl. Der zur Gährung nöthige Zucker konnte in meinen Versuchen entweder schon im trockenen Mehl vorhanden gewesen sein oder bei dem Anrühren mit Wasser durch ein diastatisches Ferment gebildet worden sein. Letztere Möglichkeit ist durchaus nicht ausgeschlossen, denn nach Angaben von Krauch[1]) kann Diastase trocken auf 120—125 ° C. erhitzt werden, ohne dass ihre Wirkung vernichtet wird. Immerhin fragt es sich, ob dieselbe ein so langes Erhitzen zu ertragen im Stande ist. Ein von mir in Bezug hierauf angestellter Versuch ergab ein negatives Resultat. Zwei gleiche Portionen Kleie wurden mit sechzigprocentigem Alcohol behandelt, dann mit Wasser ausgezogen; die eine der beiden Portionen war vor dieser Procedur 24 Stunden auf 115 ° C. erhitzt worden, die andere nicht. Der wässerige Auszug der letzteren zeigte kräftige, diastatische Wirkung, der andere zeigte nichts dergleichen. Ich kann auf diesen etwas flüchtig angestellten Versuch keinen grossen Werth legen, sollte sich aber das Resultat bestätigen, so wäre damit erwiesen, dass sich schon im trockenen Mehl ein gährungsfähiges Kohlehydrat vorfindet; nun erregen die beiden in Rede stehenden *Saccharomyces*arten, wie ich durch Versuche festgestellt habe, in Dextrin-Hefewasser[2]) keine Gährung, mithin müsste dann im Mehl Zucker oder wenigstens ein Kohlehydrat, das dem Zucker näher steht als Achrodextrin, vorhanden sein. Hierdurch wird die Frage, ob das Cerealin für die Brotgährung von Bedeutung ist, nicht direct berührt.

Kehren wir zur Frage der Alcoholgährung zurück. Ich prüfte die Sauerteigbacterien sämmtlich darauf, ob sie im Stande seien, alcoholische Gährung hervorzurufen: die Versuche ergaben ein negatives Resultat. Ich untersuchte auch, ob sie im Stande sein würden, im Mehl irgendwelche nennenswerthe Gasentwickelung hervorzubringen, und zwar wurden die Versuche analog den oben für die Sprosspilze beschriebenen angestellt. Die Versuche fielen ebenfalls wesentlich im verneinenden Sinne aus. Nur das Bacterium *B* brachte eine geringe Gasentwickelung hervor, welche mit der von ihm erregten Milchsäuregährung zusammenhängen dürfte. Danach glaube ich soviel als sicher hinstellen zu können, dass die von mir im Sauerteig aufgefundenen Bacterien zum Aufgehen desselben vor dem Backen nicht wesentlich beitragen können. Diese negativen Resultate

---

[1]) In: Adolf Mayer, Die Lehre von den chemischen Fermenten oder Enzymologie.

[2]) Zu diesem Zweck wurde ein Präparat benutzt, welches sich im Institut unter dem Namen »reinstes Dextrin« vorfand. Dasselbe gab mit Jodlösung keine Färbung, war also Achrodextrin.

konnten übrigens nicht wohl ihren Grund darin haben, dass etwa das Eiweiss des Mehles bei der Sterilisation zerstört war, denn der wässerige Auszug dieses Mehles zeigte kräftige Eiweissreaction, und man hätte erwarten müssen, dass Gährung eingetreten wäre, wenn die Bacterien eine solche, wie sie Chicandard für das Wesentliche der Brotgährung erklärt, hervorzubringen vermocht hätten.

Ich versuchte Chicandard's Ansicht noch in einer anderen Weise zu widerlegen. Obgleich der Versuch nicht in dem erwarteten Sinne ausfiel, so widerspricht er doch der Anschauung, dass die Brotgährung in der Hauptsache Alcoholgährung sei, nicht, und da er im Uebrigen einiges Interesse bietet, so will ich ihn hier anführen. In längere Zeit aufbewahrtem Sauerteig hört die Gasentwickelung schliesslich auf, wenigstens soweit man ohne besondere Apparate sehen kann. Von dem Gedanken ausgehend, dass dies aus Mangel an Gährmaterial geschehe, verdünnte ich drei gleiche Mengen solchen alten Teiges mit Wasser, fügte zu einer Portion soviel Traubenzucker, dass die Masse 2 % davon enthielt; zu der zweiten brachte ich eine reichliche Menge gut ausgewaschenen Klebers, der, um ihn besser zu vertheilen, in einer Reibschale mit Sand verrieben war, bis er nicht mehr zusammenklebte; die dritte Portion wurde ohne weitere Zusätze belassen. Ich erwartete nun, es würde die erste Portion in Gährung gerathen, die zweite und dritte Portion aber nicht, wodurch dann gezeigt worden wäre, dass die im Sauerteig vorhandenen Organismen wohl Zucker, nicht aber Kleber zu vergähren vermöchten. Nun trat zwar schon nach etwa 2 Stunden in der ersten Portion lebhafte Gährung ein, während sich die übrigen ruhig verhielten; über Nacht aber kam auch die zweite Mischung in sehr lebhafte Gährung, während die dritte auch dann ruhig verblieb. Bei der mikroskopischen Untersuchung der drei Proben zeigte sich, dass in der mit Kleber versetzten die Stärkekörner sehr stark corrodirt waren, während die anderen Proben das nur in geringem Grade zeigten, so wie man es im Sauerteig stets findet. Es hatte offenbar der Kleber eine kräftige, diastatische Wirkung ausgeführt — eine solche wird für denselben ja vielfach angegeben — und hatte so das Material für die Gährung geliefert. Selbstverständlich kann aus diesem Versuch kein Argument gegen Chicandard's Ansicht hergeleitet werden. Um mit Sicherheit darzuthun, dass das Aufgehen des Sauerteigs allein von *Saccharomyces*arten bewirkt wird, wäre es nöthig, zu zeigen, dass dieselben in der Menge, wie sie im Sauerteig vorhanden sind unter den gleichen Bedingungen in der gleichen Zeit die gleiche Gasmenge produciren können, wie der Sauerteig in toto, wobei jede Mitwirkung von Bacterien ausgeschlossen werden müsste. Diesem Versuch stehen grosse Schwierigkeiten entgegen, die ich nicht zu beseitigen vermochte. Dünnenberger's Versuch über diesen Punkt beantwortet obige Frage nicht correct.

Was nun die bei der Brotgährung entstehenden Säuren anbetrifft, so geben meine Untersuchungen zunächst über die Herkunft der Essigsäure genügende Auskunft. Das Bacterium *C* vermag Alcohol in Essigsäure überzuführen. Die nöthigen Materialien findet es im Sauerteig vor; Alcohol wird durch die Sprosspilze gebildet und atmosphärische Luft ist in genügender Menge im Teig vorhanden, um die Oxydationsgährung zu ermöglichen. Kleine Mengen von Essigsäure werden auch als Nebenproduct bei der alcoholischen Gährung erzeugt. Ferner habe ich gezeigt, dass Bacterium *B* im Stande ist, Milchsäure zu produciren, und es liegt kein Grund vor, weshalb es diese Wirkung nicht auch im Sauerteig haben sollte. Dagegen ist es mir nicht gelungen, den Producenten der Buttersäure, die nach Angaben Birnbaum's und Anderer im Sauerteig gebildet werden soll, aufzufinden.

Bacillus *D* ist im Stande, Stärke zu lösen, Bacillus *E* vermag ausserdem Eiweiss zu peptonisiren. Beide dürften diese Wirkung auch im Sauerteig ausüben. Durch den ersten Process liefern sie vielleicht zum Theil die Materialien für die alcoholische und Milchsäuregährung, durch die Peptonisirung wird eine wichtige Veränderung im Teig hervorgebracht.

Bacillus *E* scheint mir auch bei der von Laurent beschriebenen Brotverderbniss eine grosse Rolle zu spielen. Da mir solches verdorbenes Brot nicht zur Verfügung stand, so benutzte ich Laurent's Recept zur Herstellung desselben, indem ich ein Stück Brot mit ganz verdünntem Ammoniak übergoss und es dann bei 30° C. hielt; es stellten sich bald die von Laurent beschriebenen Erscheinungen vollkommen ein. Die mikro-

skopische Prüfung zeigte eine ganze Reihe verschiedener Bacterien, so dass Laurent wohl zu weit geht, wenn er den ganzen Process einem einzigen Organismus in die Schuhe schieben will, besonders da augenscheinlich sehr mannigfaltige Producte entstehen. Der Bacillus *E* war besonders im Anfang in grossen Massen vorhanden, und ich halte es für wahrscheinlich, dass er wenigstens zum Theil die Verwandlung der Stärke in Dextrin besorgt. Ich habe den Vorgang nicht näher verfolgt, da er zur genauen Ergründung einer weitläufigen Untersuchung bedarf und der Gegenstand ausserhalb meiner Fragestellung liegt.

Das Resultat der vorliegenden Untersuchung lässt sich kurz dahin zusammenfassen, dass die durch Sauerteig hervorgerufene Brotgährung aus einer Reihe nebeneinander herlaufender, zum Theil ineinandergreifender Umsetzungsprocesse besteht, deren wesentlichster, die alcoholische Gährung, durch Saccharomyceten hervorgerufen wird, während die durch Bacterien hervorgerufenen Säuregährungen und Lösungsvorgänge erst in zweiter Linie in Betracht kommen[1]).

Es wurde im Obigen nur versucht, in allgemeinen Zügen die einzelnen Vorgänge, welche im Sauerteig stattfinden, zu ermitteln und auf ihre Ursachen zurückzuführen. Wie sich dieselben nun speciell im Sauerteig gestalten, wie sie vielleicht aufeinander einwirken, und in welchen quantitativen Verhältnissen sie vorkommen, das sind Fragen, die erst auf Grund jener allgemeinen Uebersicht gelöst werden können, und die hier zunächst unberücksichtigt blieben.

Strassburg i. E., Juli 1888.

---

[1]) Diese letzteren Vorgänge sind jedoch durchaus nicht absolut nutzlos, wie Dünnenberger will. Hierfür noch ein Beispiel: Die von Laurent beschriebene Brotverderbniss führt oft zu erheblichen Verlusten; nun tritt dieselbe nach seinen Untersuchungen dann auf, wenn das Brot nicht Säure genug enthält; mithin bauen die beiden säurebildenden Bacterien diesem Uebel vor, ein Nutzen, der gewiss nicht zu gering anzuschlagen ist.

Curriculum vitae.

Geboren wurde ich, Wilhelm Ludwig Peters, am 15. Mai 1866 in Hamburg als Sohn des Brennereibesitzers J. J. W. Peters. Ich besuchte anfangs eine Privatschule und später das Realgymnasium des Johanneums zu Hamburg, von welchem ich Michaelis 1884 mit dem Zeugniss der Reife entlassen wurde. Sodann bezog ich die Universität Freiburg i/B., um dem Studium der Naturwissenschaften obzuliegen; zum Wintersemester 1886—87 ging ich nach Strassburg, wo ich weitere vier Semester studirte. Meine Lehrer waren die Herrn Professoren Baumann, Claus, Elbs, Klein, Warburg, Weismann, Willgerodt in Freiburg; de Bary, Fittig, Kohlrausch, Kundt, Rose, Solms, Wortmann, Zacharias in Strassburg.

Es sei mir gestattet allen diesen meinen verehrten Lehrern an dieser Stelle meinen wärmsten Dank auszusprechen für alle Belehrung und Anregung, welche mir durch sie zu Theil geworden ist.

Druck von Breitkopf & Härtel in Leipzig.